

Rhcdopseudomcnas spheroidesの明菌および暗菌の デオキシリボ核酸(DNA)の比較的研究

著者	酒井 秀章
号	567
発行年	1969
URL	http://hdl.handle.net/10097/18616

氏 名 (本 籍) さ か い ひ で あ き
酒 井 秀 章

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 5 6 7 号

学位授与年月日 昭 和 4 4 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究科
(博 士 課 程) 内 科 学 専 攻

学位論文題目 Rhodopseudomonas spheroidesの明菌お
よび暗菌のデオキシリボ核酸 (D N A) の比
較的研究

(主 査)

論文審査委員 教授 山 形 徹 一 教授 菊 地 吾 郎

教授 吉 沢 善 作

教授 石 田 名 香 雄

論 文 内 容 要 旨

非硫黄光合成細菌 *Rhodospseudomonas spheroides* (*R. spheroides*) 光合成的にも、非合成的にも生育しうる。嫌気明条件で生育した菌(暗菌)からは光磷酸化を活発に行なり顆粒が得られ、電子顕微鏡でも細胞内構造体としてクロマトフォア(Chr)が存在することが認められている。しかし、このChr は好気暗条件で生育した菌(暗菌)には存在しない。また暗菌は低酸素分圧、暗条件下で、細胞の増殖を伴わずにChr を誘導的に形成することが知られており、このChr の形成は蛋白合成阻害剤やRNA合成阻害剤だけでなく、DNA合成阻害剤によつても強く阻害されることが見出されている。したがつて、Chr の形成には何らかの形でDNAの代謝が関与している可能性が考えられる。そこで*R. spheroides* のChr 形成に直接関与するDNAの存否、またもしあるとすればその役割も解明しようと考え、その最初の手がかりを得るために、明菌、暗菌およびChr を誘導的に形成させた菌よりDNAを抽出し、それらの性質をメチル化アルブミン(MAK)カラム、CsCl密度平衡遠心、蔗糖濃度勾配遠心により比較検討を行なつた。

培地にはグルタミン酸ソーダ、リンゴ酸を炭素源とするMedium Sを使用し、明菌では白色光を当て28°C に3~5日放置、暗菌は暗所で20時間前後振盪し、いずれもstationary phaseの前期に集菌した。³²Pでラベルする場合にはP欠乏培地に³²Piを加えた。また菌体を音波処理し、10,000×g 上清で105,000×g 沈澱を顆粒区分(Chr, リボソームを含む)とした。DNAの抽出方法は、lysozyme, colimycin, sodium lauryl sulfate により菌体を破壊し、クロロホルムで除蛋白し、アルコールでDNAを沈澱させ、さらにRNase I, RNase T₁によりRNAを分解し、pH9フェノールで除蛋白し精製し、DNA標品を得た。

まずはじめに、MAKカラムによる溶出パターンをみると、明菌DNAは暗菌DNAに比べ、260_{mu} 吸光度および³²P活性とも0.65~0.7M食塩濃度で溶出されてくるmain peakのあとに0.7~0.75M食塩濃度で溶出されてくるいわゆるtailing 区分が多く含まれている。このtailing 区分を濃縮し、DNase 処理を行なうと完全に水解されるが、RNase では水解されなかつた。またCsCl 密度平衡遠心による沈降パターンをみると、main peak とtailing 区分との間に差はみられず、密度、塩基組成に相違はみられなかつた。

次に、CsCl 密度平衡遠心による沈降パターンを比べると、暗菌DNAでは $S \div 1.74$ に左右対称のピークを示すが、明菌DNAではそのmain peakの他に $S \div 1.71, 1.69$ に肩が

みられ, minor component の存在が示唆された。暗菌の顆粒区分 DNA では main peak の他に $S \div 1.71$ に小さな肩がみられるのに対し, 明菌顆粒区分 DNA では $S \div 1.71, 1.68$ に著明な肩がみられ, 明菌 DNA の沈降パターンが強調された形を示した。これらの顆粒区分 DNA は MAK カラムでは main peak の始めの部分に溶出され, 明菌, 暗菌の顆粒区分での差はみられなかった。

さらに, 蔗糖濃度勾配遠心を行ない, 沈降速度より分子の大きさを比較すると, 先に MAK カラムでの明菌 DNA tailing 区分は main peak DNA に比べ約 4 倍の分子量を示した。また, 顆粒区分 DNA は明菌暗菌とも main peak DNA の約 5 分の 1 という結果が得られた。

次に, CsCl 密度平衡遠心による明菌 DNA の沈降パターンで肩として認められたいわゆる minor component について検討をすすめた。明菌 DNA の DNase 処理前後を分析用超遠心による沈降パターンで比較すると, DNase 処理により major component は消失したが, minor component はそのままみられた。また, 明菌 DNA の CsCl 密度平衡遠心で肩の認められないこともあり, この minor component が DNA でないという可能性も考えられた。そこで菌体に含まれている多糖類が DNA 標品中に混入したことも考え, 各 DNA 標品の多糖類をぶどう糖としてその含量を測定した。暗菌 DNA には DNA $100 \mu\text{g}$ につき $4.6 \mu\text{g}$ のぶどう糖が含まれているのに対し, 明菌 DNA では $80.6 \mu\text{g}$ も含まれていた。また, 明菌 DNA の CsCl 密度平衡遠心による分画のぶどう糖含量を測定してみると, $S \div 1.69$ 附近にぶどう糖のピークがあり, $260 \text{ m}\mu$ 吸光度および ^{32}P 活性によりみられた DNA の肩の一つに一致していた。また, ぶどう糖を多量に含む DNA 標品を DNase 処理し, 再構成実験を行なったが, 多糖類の混入と考えざるをえない結果であつた。

また, Chr 形成条件下で ^{14}C Uracil や ^{32}P i で急速にラベルされる DNA の分析も行なったが, 核 DNA と区別されるような特異な DNA が合成されている証拠は得られなかった。

以上のように, 明菌, 暗菌 DNA の性質を検討したが, 両者には分析方法に応じていくつかの相違が認められたが, いずれも両菌の DNA の質的相違を表現していると結論するには不十分であり, 明菌に特殊な DNA が存在するかどうかについては, むしろ否定的であつたといわざるを得ない。Chr の形成と DNA の代謝との間にはかなり密接な関係のあることは疑いないが, これをいづれ satellite DNA の存在を想定することによつて説明しようとするのは, いま尙早計と考えられる。現在の段階ではむしろ major DNA の一部に特に Chr 形成と関係の深い部分があり, この部分が代謝的にも不安定なのではないかと考える方がより妥当と思われる。いずれにしても $S \div 1.71$ にみられた minor component については未解決であるし, 明菌, 暗菌 DNA の分子の大きさに違いがあつたことなどは極めて反復性のある事実であり, 細胞内での DNA の存在様式の相違なども考えられるが, その説明は今後の研究にまたねばならない。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は*R. spheroides*クロマトフォア(Chr)形成に直接関与するDNAの存否、役割を解明しようと考え、その最初の手がかりを得るために、明菌、暗菌およびChrを誘導的に形成させた菌よりDNAを抽出し、それらの性質をメチル化アルブミン(MAK)カラム、CsCl密度平衡遠心、蔗糖濃度勾配遠心により比較検討を行なっている。

MAKカラムによる溶出パターンをみると、明菌DNAは暗菌DNAに比べ、260 mμ吸光度および⁸²P活性とも0.65~0.7 M食塩濃度で溶出されてくるmain peakのあとに0.7~0.75 M食塩濃度で溶出されてくるtailing区分が多く含まれている。このtailing区分を濃縮し、DNase処理を行なうと完全に水解されるがRNaseでは水解されない。またCsCl密度平衡遠心による沈降パターンをみると、main peakとtailing区分との間に差はみられず、密度、塩基組成に相違はみられない。

次に、CsCl密度平衡遠心による沈降パターンを比べると、暗菌DNAでは $\rho \div 1.74$ に左右対称のピークを示すが、明菌DNAではそのmain peakの他に $\rho \div 1.71$, 1.69に肩がみられ、minor componentの存在が示唆される。暗菌の顆粒区分DNAではmain peakの他に $\rho \div 1.71$ に小さな肩がみられるのに対し、明菌顆粒区分DNAでは $\rho \div 1.71$, 1.68に著明な肩がみられ、明菌DNAの沈降パターンが強調された形を示している。これらの顆粒区分DNAはMAKカラムではmain peakの始めの部分に溶出され、明菌、暗菌の顆粒区分での差はみられない。

さらに、蔗糖濃度勾配遠心を行ない、沈降速度より分子の大きさを比較すると、先にMAKカラムでの明菌DNA tailing区分はmain peak DNAに比べ約4倍の分子量を示し、顆粒区分DNAは明菌暗菌ともmain peak DNAの約5分の1である。

次に、CsCl密度平衡遠心による明菌DNAの沈降パターンで肩として認められたminor componentについて検討し、明菌DNAのDNase処理前後を分析用超心による沈降パターンで比較すると、DNase処理によりmajor componentは消失したが、minor componentはそのままみられる。また、暗菌DNAにはDNA 100 μgにつき4.6 μgのぶどう糖が含まれているのに対し、明菌DNAでは80.6 μgも含まれており、明菌DNAのCsCl密度平衡遠心による分画のぶどう糖含量を測定してみると、 $\rho \div 1.69$ 附近にぶどう糖のピークがあり、260 mμ吸光度および⁸²P活性によりみられたDNAの肩の一つに一致している。

以上のように、明菌、暗菌DNAの性質を検討したが、両者には分析方法に応じていくつかの相違が認められたが、いずれも両菌のDNAの質的相違を表現していると結論するには不十分であり、明菌に特殊なDNAが存在するかどうかについては、むしろ否定的であつたといわざるを得ない。現在の段階ではmajor DNAの一部に特にChr形成と関係の深い部分があり、この部分が代謝的にも不安定なのではないかと考える方がより妥当と思われる。

したがって、本論文は学位を授与するに値するものと認める。